

Un exemple de bioréacteur discontinu agité associant une enzyme immobilisée et des levures : traitement d'un lactosérum par de la β -galactosidase coréticulée avec de l'ovalbumine et co-incluse en billes d'alginate avec des levures *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ne catabolise pas le lactose. Cependant le lactosérum peut être traité par des levures incluses dans des billes d'alginate en présence d'une préparation de β -galactosidase coréticulée avec de l'ovalbumine. La coréticulation de la β -galactosidase avec l'ovalbumine permet d'obtenir des dimensions évitant la fuite de l'enzyme hors du gel et la stabilisation de l'enzyme.

Réaliser la coréticulation de la β -galactosidase et de l'ovalbumine selon le mode opératoire de l'annexe 1 et valider l'activité enzymatique de la préparation obtenue en utilisant les données du paragraphe 2 de cette même annexe 1.

Réaliser l'inclusion en alginate présentée en annexe 2 puis le montage présenté dans l'annexe 3. Suivre l'activité fermentative pendant 3 heures par mesure du volume du dioxyde de carbone produit.

Compte-rendu

Présenter et discuter tous les résultats obtenus. Présenter la chimie de la réaction de coréticulation. Pourquoi le bleu de bromothymol de l'éprouvette vire-t-il au vert ?

En règle générale, le réacteur commence à bien produire (du CO_2 et donc de l'éthanol) au bout de 30-40 minutes. Grâce à l'éprouvette graduée utilisée pour le recueil du CO_2 et un chronomètre, calculer le débit moyen de production du réacteur en CO_2 en mL/min. Connaissant la température et la pression atmosphérique et la relation $PV=nRT$, en déduire le débit production du réacteur en CO_2 en mol/min. En supposant qu'un éthanol est aussi produit pour chaque CO_2 produit (à justifier grâce à vos connaissances concernant la fermentation alcoolique), en déduire la productivité volumique horaire du bioréacteur en kg éthanol. $\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$.

Annexe 1 Co-réticulation de la β -galactosidase d'*Aspergillus niger* avec de l'ovalbumine

1. Mode opératoire de la co-réticulation

(D'après un mode opératoire aimablement fourni par JF le Flohic)

Dans un tube à centrifuger maintenu à 4°C, introduire :

- 100 mg de β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* (poudre commerciale à environ 10 U/mg (Unit Definition : One unit will hydrolyze 1.0 μmole of lactose per minute at pH at 4.5 at 30 °C.); espèce choisie car sa β -galactosidase supporte le traitement de coréticulation avec le glutaraldéhyde) ;
- 20 mg d'ovalbumine ;
- 2 mL d'eau distillée.

Ajouter lentement et sous agitation continue :

- 3,75 mL d'acétone à 4°C (voir aussi la fiche sécurité) ;
- puis 0,25 mL de glutaraldéhyde à 25 % (m/v) (voir aussi absolument la fiche sécurité).

Placer sous agitation « 3D » à 30°C pendant 60 minutes. Centrifuger 2 minutes à 2000 x g, éliminer le surnageant, ajouter 5 mL d'eau distillée. Homogénéiser à l'aide d'un ultra-turrax. Laver deux fois le culot avec 5 mL d'eau distillée, rejeter le dernier surnageant.

Stocker désormais la préparation enzymatique à 0-4°C.

2. Validation de la co-réticulation, mise en évidence d'une activité β -galactosidase de la préparation « β -galactosidase co-réticulée »

A l'aide d'une fraction aliquote de la préparation coréticulée en suspension, montrer expérimentalement qu'elle possède une activité β -galactosidase. Données : la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* présente un pH optimum de 4,5 pour le substrat 2-nitrophényl-phosphate (ONPG), et 4,8 pour le substrat naturel lactose. Les K_m sont respectivement 0,72 mM et 18 mM. L'enzyme soluble est stable à pH 4,5 et 30°C. A 30°C, le coefficient catalytique pour le lactose est égal à 1,4 fois celui pour l'ONPG. (D'après Tanaka, Kagamiishi, Kiuchi, Hoiuchi ; Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* ; J Biochem , 1975 Jan 1;77:241-7; téléchargeable à <http://bio.classes.ucsc.edu/bio100I/EXERCISES/ASSAY/75tanaka.pdf>.)

La forme déprotonée de l'ONP (2-nitrophénol, produit d'hydrolyse de l'ONPG) présente un maximum d'absorption à 415 nm. Ainsi l'ONP absorbe fortement à 415 nm en milieu alcalin (couleur jaune, le coefficient spécifique d'absorbance est voisin de $4500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ au delà de pH 10) alors qu'il n'absorbe quasiment plus à pH 4,5. L'ONPG n'absorbe pas dans le visible.

Réactifs disponibles : tampon citrate-phosphate-sodique 0,1 M pH 4,6 ; ONPG 4 mM dans le tampon ; lactose 100 mM dans le tampon ; réactif d'arrêt Na_2CO_3 1M et EDTA 4mM (ce réactif à ajouter dans les proportions 1 volume pour 3 volumes permet de dénaturer la β -galactosidase et d'alcaliniser le milieu au delà de pH 10 pour mesurer l'ONP à 415 nm) ; kit de dosage du glucose, méthode à la GOD (avec sa documentation). Matériel disponible : matériel usuel du laboratoire notamment : tubes 13 mm et thermostatisation à sec, Bechers à double enveloppe thermostatables, bains thermostatés à circulation, agitateurs magnétiques, spectrophotomètre ...

Annexe 2. Co-inclusion β -galactosidase d'*Aspergillus niger* co-réticulée avec de l'ovalbumine et levures en billes d'alginate

L'alginate est un polyside. En présence de cations divalents comme le calcium Ca^{2+} , il forme un gel. Il est possible d'inclure des cellules, des enzymes dans le réseau tridimensionnel d'un gel d'alginate. L'inclusion d'enzymes dans des billes d'alginate exige généralement des enzymes coréticulées et des gels d'alginate concentrés (concentration $> 2,5\%$ m/v) pour éviter les fuites. En effet, il ne faut pas que les enzymes incluses fuient hors du gel par simple phénomène de diffusion.

Dans le corps d'une seringue préalablement obturée, introduire :

- 2,5 g de levure (masse humide),
- la préparation enzymatique réticulée,
- 10 mL d'alginate à 2,6 % (m/v).

Homogénéiser à l'aide d'un agitateur plastique sans introduire d'air (on pourra éventuellement centrifuger). Déboucher la seringue et laisser couler goutte-à-goutte dans 50 mL d'une solution de chlorure de calcium à 2 % (m/v) sous agitation lente. Les billes sont maintenues dans la solution durant 15 minutes puis conservées à 4°C dans une solution à 0,5 % de CaCl_2 . Les billes d'alginate sont récupérées à l'aide d'un tamis.

Document annexe 3 Traitement d'un lactosérum en bioréacteur discontinu agité (BSTR)

Introduire les billes (de co-inclusion d'enzyme réticulée et de levures) et 30 mL de lactosérum (contenant 0,5 % m/v de CaCl_2) dans une fiole d'Erlenmeyer de 50 mL. Réaliser le montage de fermentation présenté ci-dessous. (Note : BBT = bleu de bromothymol, jaune à pH < 6 , bleu à pH $> 7,6$)

